

PATE ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-023900

(43)Date of publication of application : 28.01.1997

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
// C07D209/60
C12N 15/09

(21)Application number : 08-182501

(71)Applicant : LI COR INC

(22)Date of filing : 11.07.1996

(72)Inventor : PATOAY GABOR
NARAYANAN NARASIMHACHARI
BRUMBAUGH JOHN A
MIDDENDORF LYLE R

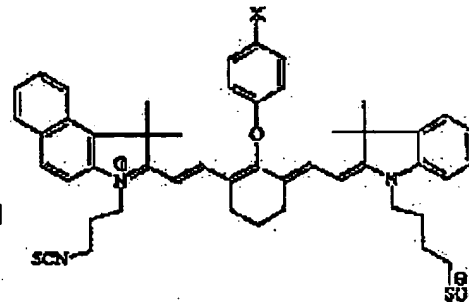
(30)Priority

Priority number : 95 500691 Priority date : 11.07.1995 Priority country : US

(54) IDENTIFICATION OF DNA CHAIN**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To identify a DNA chain with a label not deteriorated in quality and yield for purposes such as a DNA sequence-determination method by labeling the DNA chain with a fluorescent label containing a chromophore radiating specific wavelength light, irradiating the labeled DNA with light having this wavelength, and detecting the radiated light.

SOLUTION: This method for identifying a DNA chain comprises labeling a DNA chain with a fluorescent light label containing a chromophore represented by the formula (X is H, CH₃) and radiating light in a wavelength region containing at least a wavelength within either one of a far IR region, a near IR region and an IR region, applying the labeled DNA sample to plural sites in a gel electrophoresis slab or a capillary set in order to electrically migrate the labeled DNA sample into plural channels through the gel electrophoresis slab or the capillary set, establishing an electric voltage in the whole applied sites, dividing the DNA sample into fluorescent labeled DNA bands in the gel electrophoresis slab or the capillary set in response to the size of the DNA sample, irradiating the labeled DNA with light having a wavelength within either of the far IR light region, the near IR light region and the IR light region and detecting light radiated from the fluorescent label to identify the DNA chain.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 28.09.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 26.06.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-23900

(43) 公開日 平成9年(1997)1月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
// C 0 7 D 209/60			C 0 7 D 209/60	
C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願平8-182501

(22) 出願日 平成8年(1996)7月11日

(31) 優先権主張番号 5 0 0 6 9 1

(32) 優先日 1995年7月11日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 592056964

リーコール・インコーポレーテッド
L I - C O R I N C O R P O R A T E D
アメリカ合衆国ネブラスカ州68504, リン
カーン, スペリアー・ストリート 4421

(72) 発明者 ガーバー・バトナイ

アメリカ合衆国ジョージア州30208, コン
ヤーズ, デンナード・ロード 2779

(72) 発明者 ナラシムハチャリ・ナラヤナン

アメリカ合衆国ネブラスカ州68516, リン
カーン, サウス・サード・セカンド・ス
トリート 7334

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

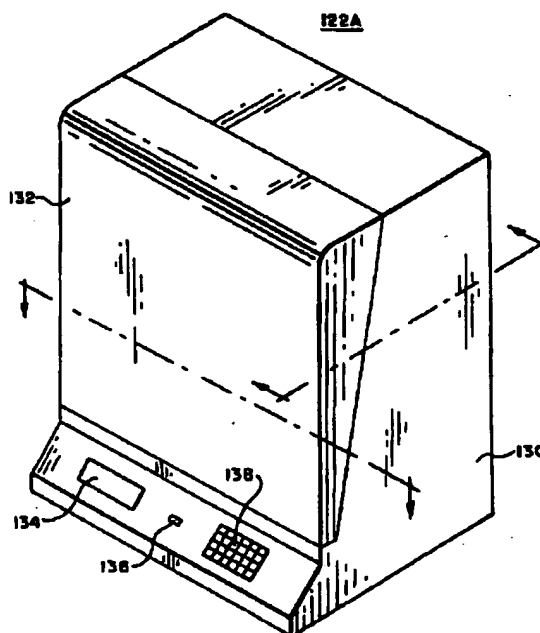
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA鎖の同定方法

(57) 【要約】

【課題】 DNA鎖の同定方法を提供すること。

【解決手段】 DNAを自動的に配列決定するために、遠赤外、近赤外及び赤外蛍光染料で標識したDNAをゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットを通しての複数のチャンネルに電気泳動させ、DNAサンプルを前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中のDNAフラグメントのサイズに応じて蛍光標識DNA帯に分割する。分離されたサンプルを光電的にレーザーダイオード及びセンサーによって照射して、レーザーが前記蛍光標識DNAサンプルの吸光スペクトルの範囲内の波長の走査光線によって走査して、標識DNAの放射波長の光を感知する。

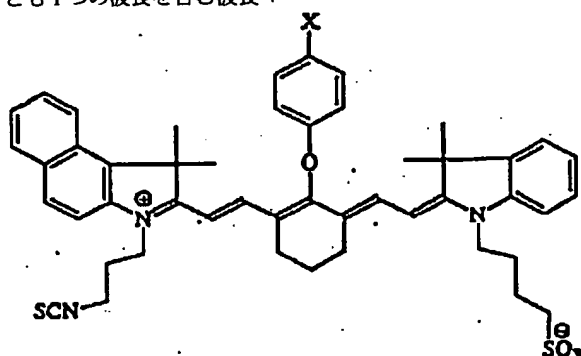


【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の工程：遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の少なくとも1つの波長を含む波長*

*領域で光を放射し、式：

【化1】



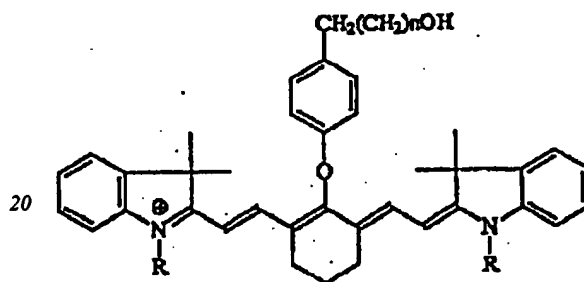
【式中、XはH又はCH₃である】で示される発色団を含む蛍光ラベルでDNA鎖を標識する工程と；遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の波長を有する光線で前記DNA鎖を照射する工程と；前記蛍光ラベルから放射される光を検出する工程とを含むDNA鎖の同定方法。

【請求項2】 検出工程が遠赤外、近赤外及び赤外レーザーダイオード光源のいずれかの照射による検出工程を含む、請求項1記載のDNA鎖の同定方法。

【請求項3】 DNAと結合したときに遠赤外、近赤外及び赤外波長のいずれかにおいて吸収及び最大蛍光を示す蛍光染料によって標識したDNAサンプルを、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットを通しての複数のチャンネルに電気泳動させるために、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の複数の箇所に適用する工程と；前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットの全体に電位を確立して、DNAサンプルをDNAフラグメントのサイズに応じて前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の蛍光標識DNAバンドに分割する工程と；分離されたサンプルがスラブ若しくは毛管セット中にあるときに、これらのサンプルを光電的にレーザーダイオード及びセンサーによって照射し、ここでレーザーは前記蛍光標識DNAサンプルの吸光スペクトルの範囲内の波長の遠赤外、近赤外及び赤外走査光線によって走査し、標識DNAの放射波長の光を感知する工程とをさらに含む請求項1記載の方法。

【請求項4】 次の工程：遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の少なくとも1つの波長を含む波長領域で光を放射し、式：

【化2】



20

【式中、Rはエチル又は4-スルホナトブチルであり、nは1又は2のいずれかである】で示される発色団を含む蛍光ラベルでDNA鎖を標識する工程と；遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の波長を有する光線で前記DNA鎖を照射する工程と；前記蛍光ラベルから放射される光を検出する工程とを含むDNA鎖の同定方法。

30

【請求項5】 検出工程が遠赤外、近赤外及び赤外レーザーダイオード光源のいずれかの照射による検出工程を含む、請求項4記載のDNA鎖の同定方法。

40

【請求項6】 DNAと結合したときに遠赤外、近赤外及び赤外波長のいずれかにおいて吸収及び最大蛍光を示す蛍光染料によって標識したDNAサンプルを、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットを通しての複数のチャンネルに電気泳動させるために、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の複数の箇所に適用する工程と；前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットの全体に電位を確立して、DNAサンプルをDNAフラグメントのサイズに応じて前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の蛍光標識DNAバンドに分割する工程と；分離されたサンプルがスラブ若しくは毛管セット中にあるときに、これらのサンプルを光電的にレーザーダイオード及びセンサーによって照射し、ここでレーザーは前記蛍光標識DNAサンプルの吸光スペクトルの範囲内の波長の遠赤外、近赤外及び赤外走査光線によって走査し、標識DNAの放射波長の光を感知する工程とをさらに含む請求項4記載の方法。

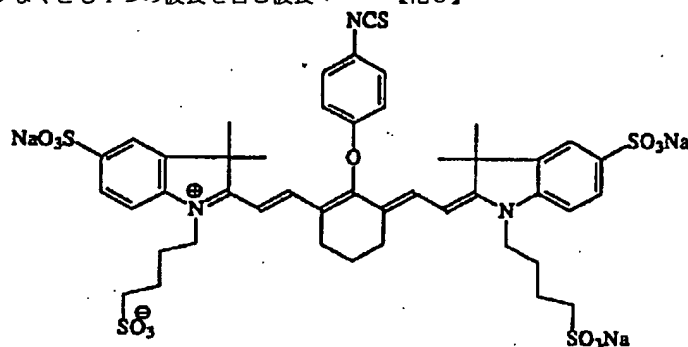
50

3

4

【請求項7】 次の工程：遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の少なくとも1つの波長を含む波長*

【化3】



で示される発色団を含む蛍光ラベルでDNA鎖を標識する工程と；遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の波長を有する光線で前記DNA鎖を照射する工程と；前記蛍光ラベルから放射される光を検出する工程とを含むDNA鎖の同定方法。

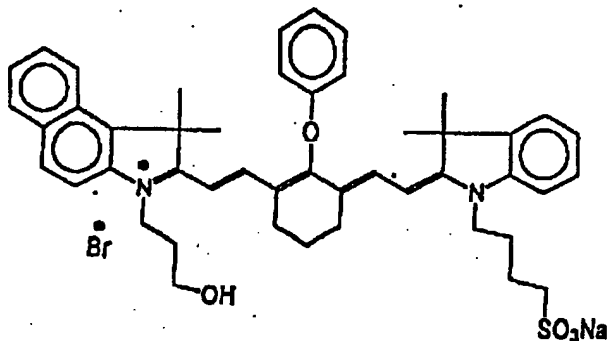
【請求項8】 検出工程が遠赤外、近赤外及び赤外レーザーダイオード光源のいずれかの照射による検出工程を含む、請求項7記載のDNA鎖の同定方法。

【請求項9】 DNAと結合したときに遠赤外、近赤外及び赤外波長のいずれかにおいて吸収及び最大蛍光を示す蛍光染料によって標識したDNAサンプルを、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットを通しての複数のチャンネルに電気泳動させるために、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の複数の箇所適用する工程と；前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットの全体に電位※

※を確立して、DNAサンプルをDNAフラグメントのサイズに応じて前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の蛍光標識DNAバンドに分割する工程と；分離されたサンプルがスラブ若しくは毛管セット中にあるときに、これらのサンプルを光電的にレーザーダイオード及びセンサーによって照射し、ここでレーザーは前記蛍光標識DNAサンプルの吸光スペクトルの範囲内の波長の遠赤外、近赤外及び赤外走査光線によって走査し、標識DNAの放射波長の光を感知する工程とをさらに含む請求項7記載の方法。

【請求項10】 次の工程：遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の少なくとも1つの波長を含む波長領域で光を放射し、式：

【化4】



で示される発色団を含む蛍光ラベルでDNA鎖を標識する工程と；遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の波長を有する光線で前記DNA鎖を照射する工程と；前記蛍光ラベルから放射される光を検出する工程とを含むDNA鎖の同定方法。

【請求項11】 検出工程が遠赤外、近赤外及び赤外レーザーダイオード光源のいずれかの照射による検出工程を含む、請求項10記載のDNA鎖の同定方法。

【請求項12】 DNAと結合したときに遠赤外、近赤外及び赤外波長のいずれかにおいて吸収及び最大蛍光を示す蛍光染料によって標識したDNAサンプルを、ゲル

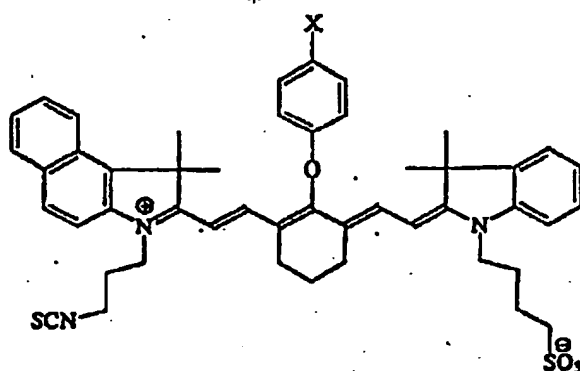
電気泳動スラブ若しくは毛管セットを通しての複数のチャンネルに電気泳動させるために、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の複数の箇所適用する工程と；前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットの全体に電位を確立して、DNAサンプルをDNAフラグメントのサイズに応じて前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の蛍光標識DNAバンドに分割する工程と；分離されたサンプルがスラブ若しくは毛管セット中にあるときに、これらのサンプルを光電的にレーザーダイオード及びセンサーによって照射し、ここでレーザーは前記蛍光標識DNAサンプルの吸光スペクトルの範囲内の波長

5

6

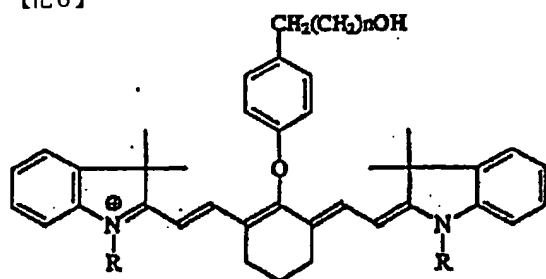
の遠赤外、近赤外及び赤外走査光線によって走査し、標識DNAの放射波長の光を感知する工程とをさらに含む請求項10記載の方法。

*【請求項13】 式：
【化5】



〔式中、XはH又はCH₃である〕で示される化合物を含む染料。

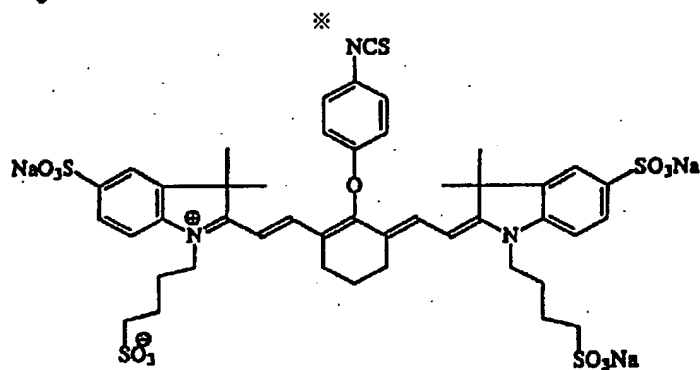
【請求項14】 式：
【化6】



※〔式中、Rはエチル又はスルホナトブチルであり、nは1又は2のいずれかである〕で示される化合物を含む染料。

【請求項15】 式：
【化7】

20



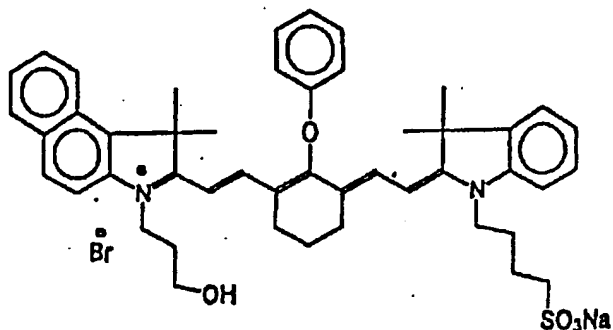
で示される化合物を含む染料。
【請求項16】 式：

【化8】

40

7

8

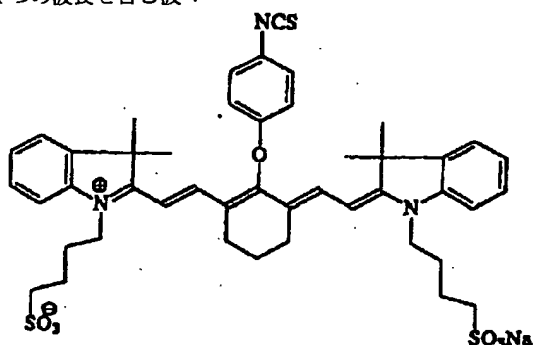


で示される化合物を含む染料。

【請求項17】 次の工程：遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の少なくとも1つの波長を含む波 *

*長領域で光を放射し、式：

【化9】



で示される発色団を含む蛍光ラベルでDNA鎖を標識する工程と；遠赤外、近赤外及び赤外領域のいずれかの範囲内の波長を有する光線で前記DNA鎖を照射する工程と；前記蛍光ラベルから放射される光を検出する工程とを含むDNA鎖の同定方法。

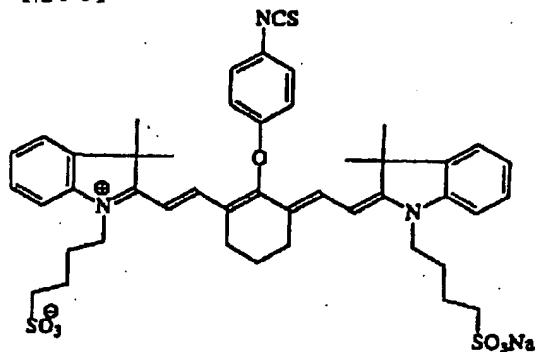
【請求項18】 検出工程が遠赤外、近赤外及び赤外レーザーダイオード光源のいずれかの照射による検出工程を含む、請求項17記載のDNA鎖の同定方法。

【請求項19】 DNAと結合したときに遠赤外、近赤外及び赤外波長のいずれかにおいて吸収及び最大蛍光を示す蛍光染料によって標識したDNAサンプルを、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットを通しての複数のチャンネルに電気泳動させるために、ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の複数の箇所に適用する工程と；前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セットの全体に電位を確立して、DNAサンプルをDNAフラグメントのサイズに応じて前記ゲル電気泳動スラブ若しくは毛管セット中の蛍光標識DNAバンドに分割する工程と；分離されたサンプルがスラブ若しくは毛管セット中にあるときに、これらのサンプルを光電的にレーザーダイオード及びセンサーによって照射し、ここでレーザーは前記蛍光標識DNAサンプルの吸光スペクトルの範囲内の波長の遠赤外、近赤外及び赤外走査光線によって走査し、標識DNAの放射波長の光を感知する工程とをさらに含む請求項17記載の方法。

【請求項20】 式：

【化10】

30



で示される化合物を含む染料。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は蛍光標識DNAの配列決定と、レーザーからの光線による照射後のDNA検出と、そのための適切なラベルとに関する。

【0002】

【従来の技術】 DNAの配列決定方法の1種では、DNAの同じ鎖を蛍光染料で標識する。特別に合成した蛍光オリゴヌクレオチドプライマー若しくはプローブをDNA鎖に結合させることによって、又は蛍光染料を鎖に直接結合させることによって、鎖を標識する。

50

【0003】鎖を4アリコートに分離する。一定アリコート中の鎖はアデニン、グアニン、シトシン及びチミン（以下では、A、G、C及びT）の4種類の塩基の1種類のみに属する任意の塩基において個々に切断されるか又はこのような塩基にまで合成される。アデニン、グアニン、シトシン及びチミン末端鎖を次に電気泳動させて、分離し、分離した鎖をレーザーによって照射し、蛍光染料からの発光を検出する。電気泳動の速度はDNA配列を暗示する。

【0004】この種の先行技術配列決定方法では、マーカーとして用いる蛍光染料は可視領域にそれらの最大発光スペクトルを有するので、DNAを可視スペクトルの範囲内で照射し、可視スペクトル検出器と光源とを用いる。一般に、検出には光電増倍管(photomultiplier) (PMT)を用いる。

【0005】DNA配列決定の先行技術方法は、例えば（1）染料は光線スペクトルの可視領域にそれらの発光スペクトルを有するので、蛍光マーカーの励起に用いるレーザーと、ある一定の条件下での光の検出器とは高価になる傾向がある；また（2）これらはバイオ分子(bio molecule)によるバックグラウンド干渉のために比較的ノイズが多いと言ったような、幾つかの欠点を有する。

【0006】シアニン染料は遠赤外(600~700nm)と近赤外(700~1200nm)光線を吸収することが知られ、シアニン染料の誘導体の合成方法は周知である。しかし、ダイオードレーザー走査の照射時にゲル電気泳動装置中のバックグラウンド雑音の影響を減ずる吸光度及び発光帯を有する発色団を得ることは困難であった。本明細書に開示しない、他の染料は1200nmより大きい波長に吸光度を有し、バックグラウンドノイズから識別される。

【0007】安定な種類のシアニン染料には、ヘプタメチンシアニン染料を含む。シアニン染料は伝統的に、活性化メチル基を含むヘテロ環式塩基と不飽和ビスアルデヒド若しくはこの同等物との間の縮合反応によって、通常はShiff塩基として、触媒の存在下で合成されている。触媒としては、酢酸ナトリウムが最も頻繁に用いられる。ヘプタメチンピリウム染料の合成におけるように、エタノールの他に、例えば酢酸及び無水酢酸のような溶媒も一般に用いられる。この方法は、例えば

（1）アニリンによる副生成物のために、生成物の精製が非常に困難である；（2）触媒の使用が生成物の純度を低下させ、反復精製を正当化する；（3）反応が一般に急速であり、非対称的染料の合成にワンポット(one pot)で用いることはできない；及び（4）反応生成物をより多量にスケールアップすることは幾つかの問題を惹起し、品質及び収率を劣化させる。

【0008】

【発明が解決しようとする問題】したがって、新規なDNA配列決定方法を提供することが、本発明の目的であ

る。

【0009】遠赤外、近赤外及び赤外蛍光標識DNAの配列決定とレーザーダイオードからの光線による照射後のDNA検出とのための新規な装置及び方法を提供することが、本発明の他の目的である。

【0010】遠赤外、近赤外又は赤外領域において蛍光を発する、新規な染料を提供することが、本発明のさらに他の目的である。

【0011】ある一定の特徴を有する染料を合成する新しい、新規な方法を提供することが、本発明のさらに他の目的である。

【0012】オリゴヌクレオチドに結合したときに、遠赤外、近赤外又は赤外領域の特定の波長において蛍光を発し、検出を容易にするほど充分な量子収率を示す、新規な染料を提供することが本発明のさらに他の目的である。

【0013】遠赤外、近赤外又は赤外領域において蛍光を発する染料を含む、新規なプローブ又はプライマーを提供することが、本発明のさらに他の目的である。

【0014】DNAの連続配列決定方法を提供することが、本発明のさらに他の目的である。

【0015】蛍光検出を利用してDNAを連続配列決定するための新規な方法を提供することが、本発明のさらに他の目的である。

【0016】DNAに固定された、新規な蛍光マーカーを用いるDNA配列決定の新規な方法を提供することが、本発明のさらに他の目的である。

【0017】標識DNAフラグメントをバックグラウンド蛍光からより明確に識別する蛍光標識DNAを連続配列決定するための新規な方法を提供することが、本発明のさらに他の目的である。

【0018】新規な蛍光マーカー、このマーカーの合成方法、及びDNAへのマーカーの結合方法を提供することが、本発明のさらに他の目的である。

【0019】ダイオードレーザー源とダイオード検出器とを用いて、標識分子(DNA分子を含む)の検出を可能にする、新規な方法、マーカー及び装置を提供することが、本発明の他の目的である。

【0020】新規な蛍光染料を提供することが、本発明の他の目的である。

【0021】本発明の上記その他の目的によると、遠赤外、近赤外及び赤外蛍光標識DNAの配列決定と、レーザーダイオードからの遠赤外、近赤外又は赤外光線による照射後のDNA検出とが、新規なラベルを用いて、達成される。例えば（1）DNA配列決定；及び（2）例えば制限酵素切断又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような方法によって製造される、長さの異なる鎖の分析のような、幾つかの目的のいずれかのために、DNA鎖を連続的に電気泳動し、同定する。

【0022】同定を容易にするために、遠赤外、近赤外

及び赤外領域で発光する蛍光ラベルによって鎖を標識する。遠赤外、近赤外又は赤外領域の光線によって鎖を照射して、蛍光ラベルから放射される光を検出し、これを用いて、DNA鎖に関する情報を得る。

【0023】標識は蛍光マーカを鎖に直接ラベリング (labeling) することによって、又は蛍光標識したプローブ若しくはプライマーを、分離した鎖にハイブリッド化することによって実施する。1実施態様では、遠赤外、近赤外又は赤外レーザーダイオード光源によって走査することによって、鎖を検出する。

【0024】走査装置は、マーカの最適吸収スペクトル近く又は内の波長の光線を放射するレーザーダイオードと、マーカの最適放射スペクトル近く又は内の波長の光を検出するダイオード検出器とを含む。好ましい実施態様では、ダイオードレーザーがDNA鎖のチャンネルをマーカの吸光領域に適合する波長を有する近赤外光線によって照射し、検出器はマーカの近赤外発光に敏感なアバランシェフォトダイオードを含む。スキャナは蛍光マーカの最適発光を光センサーまで選択的に通す通過帯域を有する濾過系を含むことができる。

【0025】フォトダイオード、光電増倍管又は他の光検出器は、シグナル/ノイズ比を強化する方法を用いて、蛍光を選択的に検出する。1つの方法はレーザーを駆動する電流をパルス化することによってレーザー源をモジュレートし、ロックイン (lock-in) 増幅器を介して検出を行うことである。蛍光マーカの高発光スペクトルを含む波長帯において検出を実施する。

【0026】DNA鎖を標識するために、望ましい性質を有する新規な染料を新規なルートによって合成するか、又は既知染料を修飾する。好ましい実施態様では、新規な染料は好ましいスペクトルを有し、高度な吸収性と蛍光性を有し、例えばDNA、タンパク質及び抗体のようなバイオ分子にカップリング (coupling) することができる少なくとも1つの反応基を有する。

【0027】染料は合成するか、既知染料から修飾するか、又はプローブ、プライマー、オリゴヌクレオチド若しくは他の分子に結合したときに遠赤外、近赤外若しくは赤外領域を含む領域内に吸光帯及び発光帯を有するように選択する。染料はバックグラウンドノイズを減ずるように選択された光学帯 (optical band) において高い量子収率を与えるべきである。バイオ分子のラベリングを必要とする多くの用途に好ましい染料は、バイオ分子のアミノ基と反応して、チオ尿素結合を形成するNC S基を染料上に有するか、又はバイオ分子のアミノ基と反応して安定なアミド基を形成するNH Sエステルに転化することができるカルボキシル基を有するか、又はバイオ分子と反応して、NH Sエステル活性化を介して安定なカルバメート結合を形成するためのヒドロキシル基を有するシアニン染料である。

【0028】好ましい染料は、630～900 nmの領

域に波長を有する光線を効果的に吸収するペンタメチン若しくはヘプタメチンシアニンである。この波長はDNA配列決定におけるバックグラウンド蛍光を減ずるために適切であり、例えばGaAlAs、GaAs、InGaAlP、GaInP、AlGaAs、AlGaInP、GaAlP、InGaAsP、GaInP/AlInP、InGaP/InGaAlP、又はGaInP/AlGaInPのような物質から製造されたダイオードレーザーの放射線波長に一致する。例えば、GaAlAsダイオードは780～800 nmの領域内の波長で光線を放射し、DNA配列決定のためのゲル電気泳動サンドイッチの走査に用いられる。

【0029】適当なヘプタメチンシアニン染料の1合成方法では、2, 3, 3-トリメチルインドール又は2, 3, 3-トリメチルベンズインドールから誘導されるN-アルキル置換第4級塩と、2-クロロ-1-ホルミル-3-(ヒドロキシメチレン)シクロヘキシル-1-エンとの混合物を、溶媒としての1-ブタノールとベンゼンとの混合物 (7:3) 中で還流加熱する。触媒は用いず、水は共沸混合物として除去する。得られるクロロ化合物は近赤外領域において、強い吸収性と蛍光性を有し、染料分子を核酸に結合させるための、例えばヒドロキシ及びイソチオシアネート基のような反応性官能基を有する染料に転化する。このように修飾された染料は核酸及びタンパク質の蛍光タグとして有用である。数種類の対称的及び非対称的染料が高い収率で合成されている。

【0030】他の実施態様では、遠赤外、近赤外又は赤外染料は少なくとも4種類の染料を提供するように選択し、各染料は、各染料からの蛍光がそれを蛍光に励起させる波長によって又はそれが蛍光を発する波長によって又はこれらの両方によって、或いは染料の蛍光の寿命によって相互の染料から識別されることができるよう、相互の染料から十分に離れた励起及び/又は放射スペクトルを有する。波長間隔はレーザーダイオードによって十分に密接に維持される。例えば、Ruth, Jerry, L. (1984), DNA 3, 123に記載されているような方法によってオリゴヌクレオチドに結合させるために、染料をプローブ及びプライマー中に混入することができる。

【0031】上記概要から、本発明の蛍光標識DNAの配列決定方法は、例えば(1)染料がそれらの発光スペクトルを遠赤外、近赤外又は赤外光線スペクトル中に有するので、小さい安価なダイオードを用いることができる；及び(2)この波長領域はガラスにおける比較的低いバックグラウンド蛍光を特徴とするので、受容されるシグナルにノイズが少ないと言ったような幾つかの利点を有する。

【0032】本発明の上記その他の特徴は以下の詳細な説明から、添付図面に関連して検討するならば、さらに

13

良好に理解されるであろう。

【0033】

【課題を解決するための手段】遠赤外、近赤外及び赤外蛍光標識DNAの配列決定と、レーザーダイオードからの遠赤外、近赤外又は赤外光線による照射後のDNA検出とが、この目的のために用意され、DNAに直接結合するか又は、DNAに結合されるプローブ若しくはプライマーに結合する遠赤外、近赤外又は赤外ラベルを用いて達成される。この明細書において“赤外(infrared)”なる用語は、時には、遠赤外波長(600~700nm)、近赤外波長(700~1200nm)又は赤外波長(1200~4000nm)を含むように用いられる。例えば(1)DNA配列決定;及び(2)例えば制限酵素切断又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような方法によって製造される、長さの異なる鎖の分析のような、幾つかの目的のいずれかのために、DNA鎖を連続的に電気泳動し、同定する。

【0034】鎖を遠赤外、近赤外又は赤外領域の光線の波長においてそれらの最大蛍光又は最大吸光度を有する蛍光ラベルで標識する。鎖に遠赤外、近赤外又は赤外領域の光線を照射して、蛍光ラベルから放射される光を検出して、これを用いて、DNA鎖に関する情報を得る。検出器は好ましくは、マーカ-の赤外発光に敏感なアパランシェフォトダイオードである光センサーを含む。検出器は蛍光マーカ-の最適発光を光センサーまで選択的に通すために適した通過帯域を有する濾過系を含むことができる。

【0035】DNA鎖を標識するために、望ましい性質を有する新規な染料を製造するか、又は既知染料を修飾する。好ましい実施態様では、好ましいスペクトルを有し、高度な吸収性と蛍光性を有し、例えばDNA、タンパク質及び抗体のようなバイオ分子に結合することができる、少なくとも1つの反応基を有する新規な染料を合成する。

【0036】染料は合成するか、既知染料から修飾するか、又はプローブ、プライマー、オリゴヌクレオチド若しくは他の分子に結合したときに遠赤外、近赤外若しくは赤外領域を含む領域内に吸光帯及び発光帯を有するように選択する。染料はバックグラウンドノイズを減ずるように選択された光学帯において高い量子収率を与えるべきである。バイオ分子のラベリングを必要とする多くの用途に好ましい染料は、バイオ分子のアミノ基と反応して、チオ尿素結合を形成するNCS基を染料上に有するシアニン染料である。

【0037】好ましい実施態様では、シアニン染料を合成する。好ましい染料は750~820nm(ナノメートル)の領域に波長(最大吸光波長)を有する光線を効果的に吸収するヘプタメチンシアニンである。この波長はDNA配列決定におけるバックグラウンド蛍光を減ず

14

るために適切であり、780~800nmであるGaAlAsダイオードレーザーの放射線波長に一致する。GaAlAsダイオードは、DNA配列決定のためのゲル電気泳動サンドイッチ、カラム又は毛管を照射するために用いられる。式1~13は合成されるか又は提供される典型的な染料であり、式14は適当な修飾染料である。

【0038】式1はバイオ分子に結合するための反応基としてNCS(イソチオシアネート)を有する合成シアニンを示す。この実施態様では、XがHであるときに、最大吸光波長はメタノール中で787nmであり、DMF中では801nmであり、最大発光波長はメタノール中で807nmであり、DMSO中では818nmである。Xが-CH₃であるときに、最大吸光波長はメタノール中で786nmであり、最大発光波長はメタノール中で806nmである。両方の場合に、量子収率は15%より大きい。

【0039】式2はメタノール中で約35%の高い量子収率を有する合成シアニン染料を示す。Rがエチル又はスルホナトブチルであり、nが1又は2であるときに、最大吸光波長は762~778nmである。溶媒に依存して、最大発光波長は782~800nmである。

【0040】式3で示される合成染料では、最大吸光波長は溶媒に依存して773~778nmであり、最大発光波長は溶媒に依存して789~806nmである。量子収率は溶媒に依存して25%~35%である。

【0041】式4で示される分子では、染料はDNA配列決定のためにDNA鎖へのカップリングを可能にするためにNHSエステルに転化することができるか、又はDNA合成に用いるための染料標識アミダイトとして用いるために直接ホスフィチル化することができる。

【0042】式5によって示される合成染料では、複素環式塩基の両側の窒素基をそれらの間に間隔を維持するように選択した、幾つかのメチレンモノマーを含むポリメチレン基によってカップリングすることによって、量子収率の増加が得られる。一般に、メチレン鎖は4~10基の長さであり、9基が好ましい。同様に、エーテルを同数の基と共に用いることができる。エーテルの方が安定である。バイオ分子へのカップリングを容易にするために、官能基を結合させることができる。

【0043】式6によって示される提案分子系列は、ベンゼン環に結合したアミノ基又は他の基の使用によって、水性媒質中でのその使用を可能にする大きい溶解度を有すると期待される。表1又は2によると、この系列では、Xは酸素又はNHであり、YはNCS(イソチオシアネート)又はHであり、RはH、NCS、CH₂OH、CH₂NCS又はCOOHである。

【0044】式1

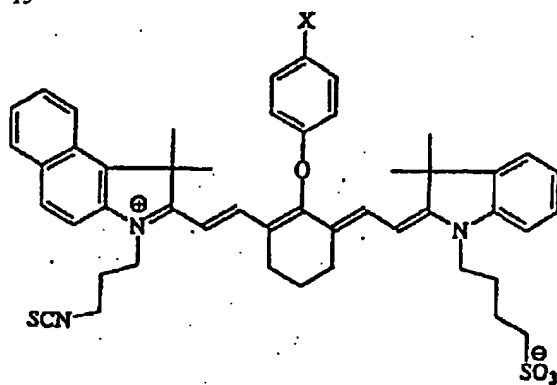
【化11】

(9)

平 9-23900

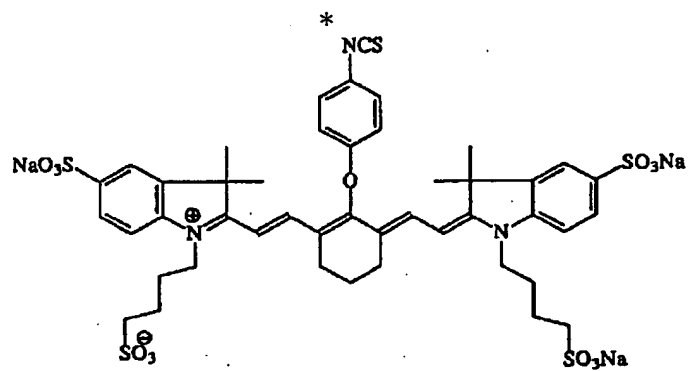
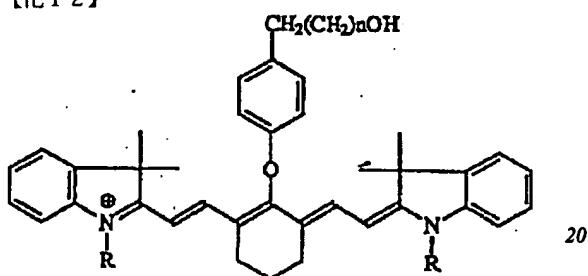
15

16



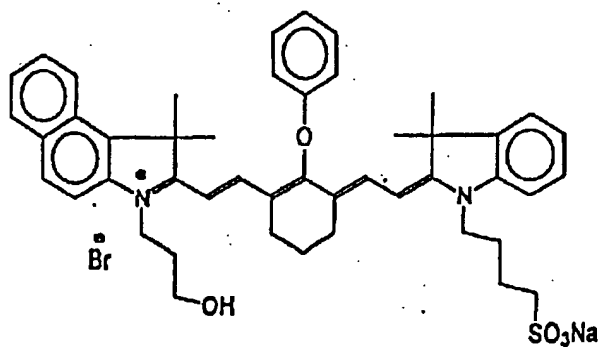
【0045】式2
【化12】

*【0046】式3
【化13】



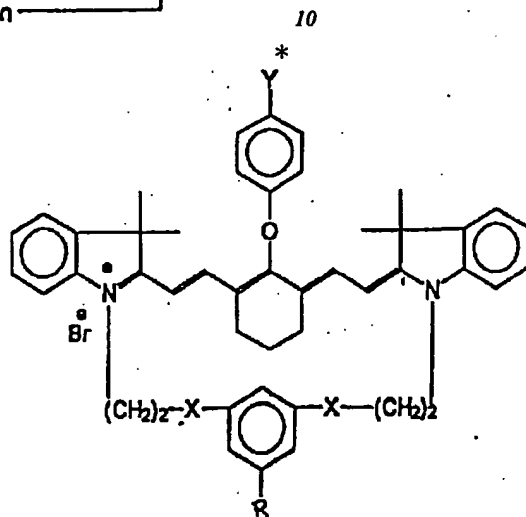
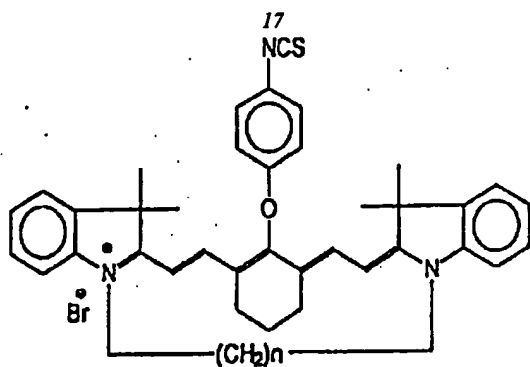
【0047】式4

【化14】



【0048】式5
【化15】

*【0049】式6
【化16】



【0050】合成染料を表す式7では、 R_1 はエチル、4-スルホナトブチル、3-アミノプロピル、フタルイミドブチル、ヘキシル及びペンチルカルボキシレートであり； Z はS、O、 CMe_2 であり、 R_2 はH、 SO_3Na 、 $SO_3^-\text{Et}_3^+\text{NH}$ 、 OCH_3 、 NO_2 、 CO_2Na 、又は $CO_2^-\text{Et}_3^+\text{NH}$ であり、 X はH、 $N(CH_2CO_2CH_3)_2$ 、 CH_2CH_2OH 、 NCS 、 $CH_2CH_2CH_2OH$ 又は $-(CH_2)_n-OH$ 【式中、 n は8から12までの任意の数である】である。

【0051】合成分子の1系列は、 R_1 が4-スルホナトブチルであり、 Z が CMe_2 である式7で示される系列である。この系列の合成分子では：

(1) X と R_2 が水素であるときに、吸光波長は767 nmであり、発光波長は767 nmであり、メタノール中での29%の高い量子収率が得られる。

【0052】(2) X が MeO に等しく、 R_2 が水素であるときに、吸光波長は水とメタノールの両方において約768 nmであり、発光波長は789 nmである。メタノール中での量子収率は35%である。

【0053】(3) X がニトロ基であり、 R_2 が水素であるときに、吸光波長は水及びメタノール中において770~774 nmであり、発光波長は水及びメタノール中において792~798 nm波長である。メタノール中で27%の高い量子収率を示す。

【0054】(4) X が NCS であり、 R_2 が水素であ

るときに(式8に示す)、吸光波長は水とメタノールの両方において約769 nmであり、発光波長は水及びメタノール中において788 nmであり、メタノール中で38%の高い量子収率を示す。

30 【0055】(5) X が NCS であり、 R_2 が OMe であるときに、吸光最大波長は水とメタノールにおいて790~796 nmであり、最大発光波長は水及びメタノール中において814 nmである。量子収率は低い。

【0056】式9によって表される分子系列は合成されており、 R_1 、 R_2 及び X が表3に示す通りであるときに、幾つかの分子はIRラベルとして有効である。

【0057】式10によって表される分子系列は合成されており、 R_1 及び X が表4に示す通りであるときに、IRラベルとして有効である。

40 【0058】式11によって表される分子系列は合成されており、 R_1 、 R_2 及び X が表5に示す通りであるときに、IRラベルとして有効である。

【0059】式12によって表される分子系列は合成されており、 R_1 、 R_3 及び R_2 が表6に示す通りであるときに、IRラベルとして有効である。

【0060】式13によって表される分子系列は合成されており、 R と X が表7に示す通りであるときに、IRラベルとして有効である。

50 【0061】他の実施態様では、遠赤外、近赤外又は赤外染料は少なくとも2種類の染料を提供するように選択

19

し、各染料は、各染料からの蛍光がそれを蛍光に励起させる波長によって又はそれが蛍光を発する波長によって又はこれらの両方によって、或いは染料の蛍光の寿命によって相互の染料から識別されることができるように、相互の染料から十分に離れた励起及び／又は放射スペクトルを有する。波長間隔はレーザーダイオードによって十分に密接に維持される。例えば、Ruth, Jerry, L. (1984), DNA 3, 123に記載されているような方法によってオリゴヌクレオチドに結合させるために、染料をプローブ及びプライマー中に混入することができる。染料は新たに合成するか、又は既存の商業的に入手可能な染料を修飾することによって調製することができる。

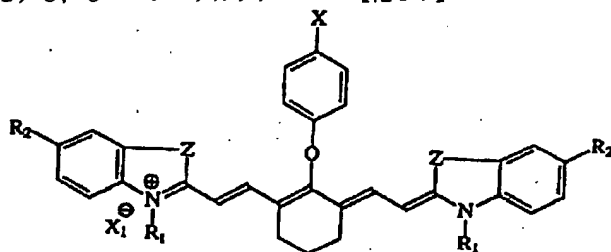
【0062】例えば(1) 3, 3'-ジエチルチアジカルボシアニンヨージド；(2) 3, 3'-ジエチルチア*

20

*トリカルボシアニンパークロレート；(3) 3, 3'-ジエチルオキサトリカルボシアニンヨージド；(4) 1, 1', 3, 3, 3', 3'-ヘキサメチルインドトリカルボシアニンパークロレート；(5) 1, 1'-ジエチル-2, 2'-ジカルボシアニンヨージド；(6) 3, 3'-ジエチルチアジカルボシアニンヨージド；(7) 3, 3'-ジエチルオキサトリカルボシアニンヨージド；(8) 1, 1', 3, 3, 3', 3'-ヘキサメチルインドトリカルボシアニンパークロレート；(9) 1, 1', 3, 3, 3', 3'-ヘキサメチルインドトリカルボシアニンヨージド；及び(10) インドシアニングリーンのような、このような修飾に適した多くの染料が存在する。

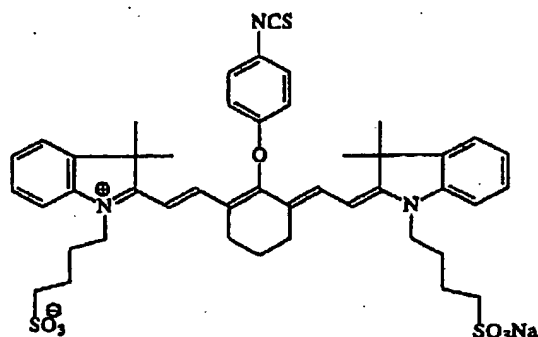
【0063】式7

【化17】



【0064】式8

【化18】



【0065】

表1

X=O (酸素) であるときの染料式6系列

X	Y	R
O	NCS	H
O	H	NCS
O	H	CH ₂ OH
O	H	CH ₂ NCS
O	H	COOH

【0066】

表2

X=NHであるときの染料式6系列

X	Y	R
NH	NCS	H
NH	H	NCS

21

NH
NH
NH

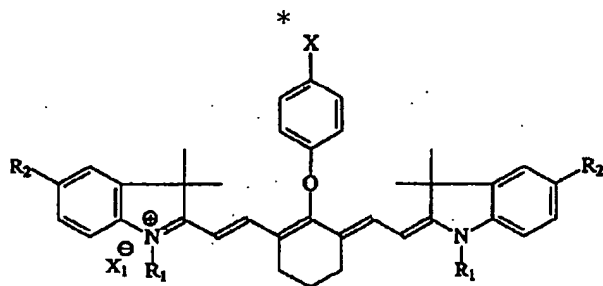
H
H
H

22

CH₂OH
CH₂NCS
COOH

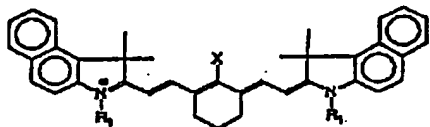
*【化19】

【0067】式9

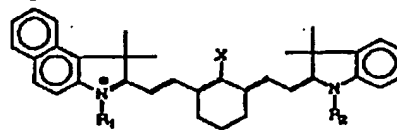


【0068】式10

【化20】



【化21】



20 【0070】

【0069】式11

表3

R ₁	R ₂	X
-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	H	NCS
-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	H	OCH ₃
-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	H	NO ₂
-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	H	H
-C ₂ H ₅ (I ⁻)	H	OCH ₃
-C ₂ H ₅ (I ⁻)	OCH ₃	OCH ₃
-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	OCH ₃	OCH ₃
-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	OCH ₃	NCS
-C ₃ H ₆ NCS (Br ⁻)	H	H
C ₂ H ₅ (I)	H	NCS
C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	SO ₃ ⁻ Na ⁺	NCS
C ₂ H ₅ (I ⁻)	SO ₃ ⁻ Na ⁺	NCS

【0071】

表4

R ₁	X
-C ₂ H ₅ (I ⁻)	OPhNCS
-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	OPhNCS
-C ₃ H ₆ NCS (Br ⁻)	OPh
フタルイミドブチル	OPhNCS

【0072】

表5

R ₁	R ₂	X
-C ₃ H ₆ NCS (Br ⁻)	-C ₄ H ₈ SO ₃ H	Cl
-C ₃ H ₆ NCS (Br ⁻)	-C ₂ H ₅	Cl
-C ₃ H ₆ NCS	-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻	OPh
-C ₃ H ₆ NCS (Br ⁻)	-C ₂ H ₅	OPh
-C ₃ H ₆ NCS	-C ₄ H ₈ SO ₃ ⁻	OPh (pMeO)

【0073】

R₁
 C₂H₅ (I⁻)
 (CH₂)₄SO₃⁻ (Na⁺)
 C₂H₅ (I⁻)
 C₂H₅ (I⁻)
 (CH₂)₄SO₃⁻ (Na⁺)

表6

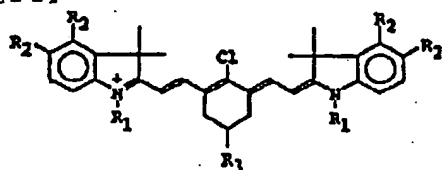
R ₃	R ₂
H	H
H	H
COOCH ₃	H
COOCH ₃	— (CH) ₄ —
COOCH ₃	— (CH) ₄ —

*【0075】式13

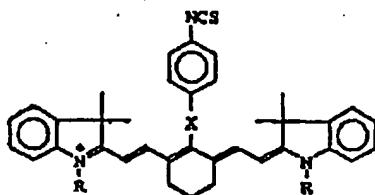
10 【化23】

【0074】式12

【化22】

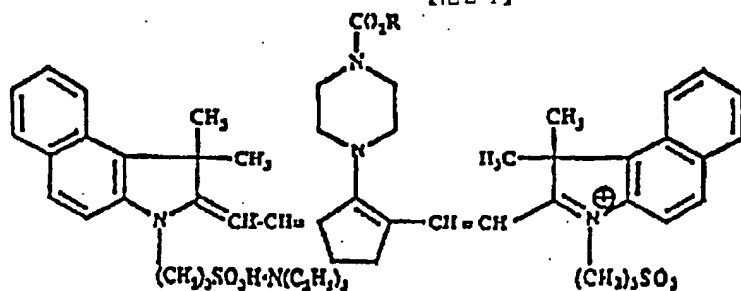


*



【0076】式14

【化24】



【0077】表7

R	X
C ₂ H ₅ (I ⁻)	O
(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	O
C ₂ H ₅ (I ⁻)	S
(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ (Na ⁺)	S

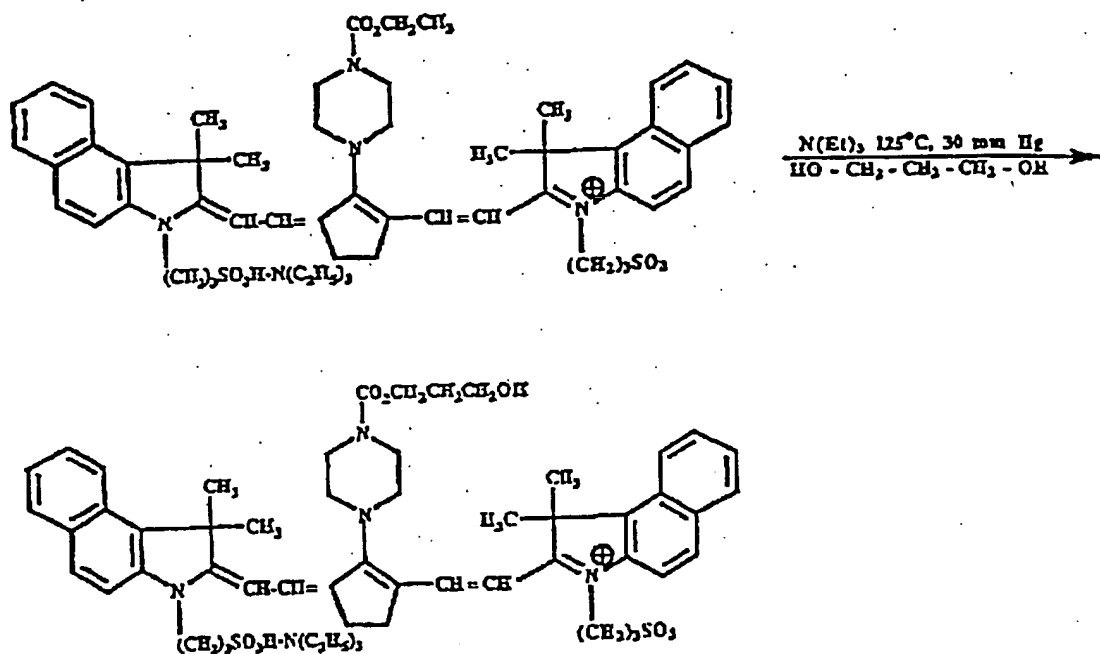
【0078】1実施態様では、染料は式14に示した化学構造【式中、Rは—CH₂CH₃である】を有する。この染料は最大蛍光の好ましい波長をほぼ有し、最大吸光度の波長は官能基Rの変化によって調節することができる。非修飾染料はEastman Kodak Company (ニューヨーク州、ロチェスター、14650)のLaboratory and Research

h Products Divisionから入手することができる。これはKodakレーザ染料、Kodak刊行物JJ-169において広告されている。

【0079】1, 3-プロパンジオールによる修飾は式1によって説明するように、技術上周知の方法で実施することができる。例えば、本来の染料分子(Rは式14の—CH₂CH₃に等しい)中のエチルアルコールの代わりに異なるエステルが形成されるときに、変化が生じる。異なるグリコールエステルが形成される場合には、これらの新しい近赤外染料の最大吸光度は長い波長にシフトする。

【0080】

【化25】



【0081】最大吸光度はグリコール官能基における酸素原子の間隔に依存する。しかし、これらの新しい近赤外染料の最大蛍光は特に式14の染料と同じ波長（すなわち、819nm）においてである。このことは、励起プロセスのみが変化したこと、すなわち、吸収中に遷移が生じるエネルギーレベルのみが変化したことを実証する。第1励起状態の最低パイロニックレベルは変化しない。幾つかのグリコールに由来するこのようなエステルの最大吸光度は次の通りである：（1）エチレングリコール796nm；（2）1, 3-プロパンジオール780nm；（3）1, 4-ブタンジオール754nm；（4）1, 6-ヘキサジオール745nm；（5）トリエチレングリコール790nm；（6）エチレンチオール810nm；及び（7）1R-144（ $R=CH_2CH_3$ ）742nm。

【0082】好ましい実施態様では、最大吸光波長は約819nmであり、適当な濾過によって、この波長を受容し、他の波長を受容しないように検出器を調節する。最大吸光度は好ましい有効(available)レーザーダイオード放射(emission)と異なる又は一致するように選択する。例えば、式14において、Rは放射光線の好ましい波長に依存して、下記7基のいずれかでありうる：

- (1) 796nmの吸光波長では、 $-CH_2CH_2OH$ ；
- (2) 780nmの吸光波長では、 $-CH_2CH_2CH_2OH$ ；
- (3) 754nmの吸光波長では、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ ；
- (4) 745nmの吸光波長では、 $-CH_2CH_2CH_2$

$CH_2CH_2CH_2OH$ ；

(5) 790nmの吸光波長では、 $-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2OH$ ；

(6) 810nmの吸光波長では、 $-CH_2CH_2-SH$ ；

(7) 742nmの吸光波長では、 $-CH_2CH_3$ ；さらに詳しくは、官能性化近赤外ラベルを製造するための可能な先駆体である、新しいヘプタメチンシアニン染料の非触媒合成では、活性化メチル基を含む複素環式塩基の第4級塩基（2当量）2-クロロ-1-ホルミル-3-（ヒドロキシメチレン）シクロヘキシー-1-エン

(2)、シクロヘキサノンから誘導される不飽和ビスアルデヒド（1当量）との混合物を、触媒を用いずに、1-ブタノールとベンゼンとの混合物（7：3）中で還流加熱する。この反応中に形成される水はDean-Stark凝縮器によって共沸混合物として除去する。この反応は完成までに一般に3～12時間を要する。得られる生成物は粗反応混合物からの染料の簡単な濾過とその後のジエチルエーテルによる洗浄後に、一般に純粋である。種々なインドールとベンゾインドール誘導体の広範囲な2-メチル-1-アルキル第4級塩基に対して、この反応を容易な方法で実施して、対応する対称的染料を形成する。この方法の重要な特徴は、反応が緩慢な速度であるため、2種類の複素環式化合物から非対称的染料を単一ポットにおいてかなり良好な収率で製造することができる点である。特定の用途と、機器との適合性のために染料のスペクトル性と物理的性質との変化が望ましい場合に、これらの非対称的染料の合成が重要になる。

27

これらの変化は染料の構造設計を適当に修飾することによって、組み込まれることができる。

【0083】染料合成をチャート1によって説明する、チャート1は式2、3、7、8及び9の合成を示す。チャート1のクロロ中間体では、 R_1 と R_2 は表9に記載する意味を有する。チャート1では、 X_1 はハロゲンである。チャート2は式10の合成を示す。ート3は式1、4及び11の合成を示す。チャート4は式12の合成を示す。チャート5は式13の合成を示す。チャート5では、 X は酸素又は硫黄である。

【0084】図1では、本発明の方法を実施することができる配列決定装置の透視図を示す。この配列決定装置は、上記米国特許出願第07/570,503号(1990年8月21日出願)；米国特許出願第07/078,279号(1987年7月27日出願)；及び米国特許第4,729,947号に構造と操作が記載されており、これらの全てはDNA配列決定なる名称であり、Middendorf等によって出願されたものである。

【0085】図2では、図1の切断ライン2-2で切断*20

28

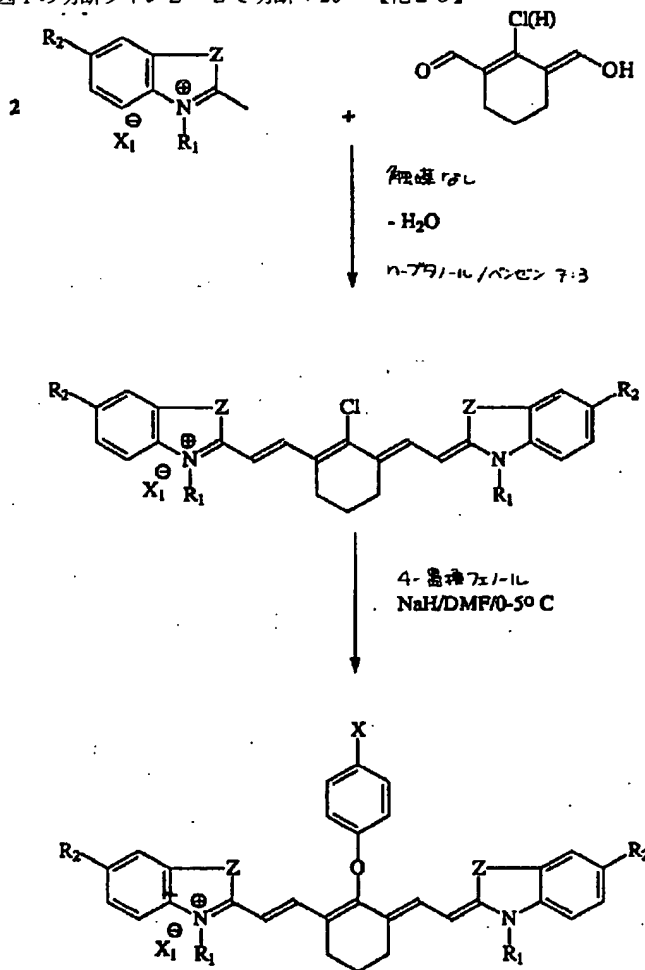
*したりモートステーション122Aの断面図であり、電気泳動区分140と、走査区分142と、電気泳動電源144と、系電源区分144Aと、アナログボード146と、デジタルボード148とを含む。電気泳動区分140はキャビネットの正面近くに配置され、その一部はアナログボード146とデジタルボード148との上の回路と協調する走査区分142によって走査されるのに適する。装置の全体はこのような操作のために電源区分144Aに電気的に接続する。

10 【0086】表9

R_1	R_2
$C_4H_8SO_3H$	H
C_2H_5	H
$C_3H_6NH_3Br^-$	H
$C_4H_8SO_3H$	$SO_3^-Na^+$
C_2H_5	$SO_3^-Na^+$
$C_4H_8SO_3H$	OCH_3
C_2H_5	OCH_3

【0087】チャート1

【化26】



【0088】チャート2

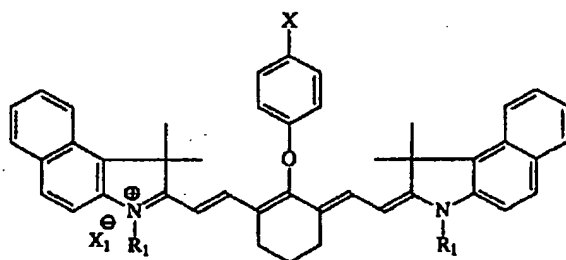
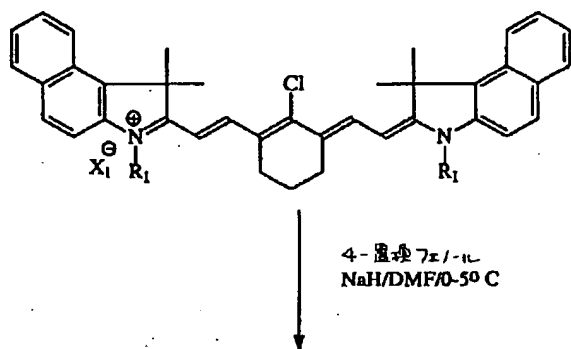
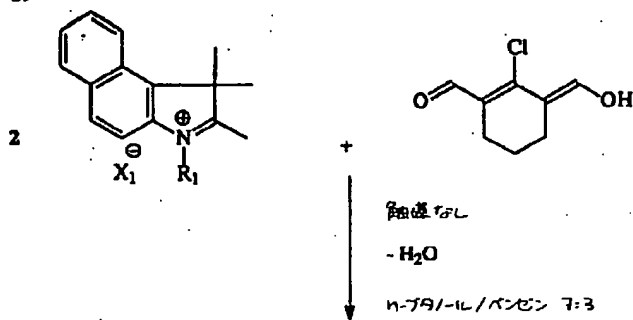
50 【化27】

(16)

平 9-23900

29

30

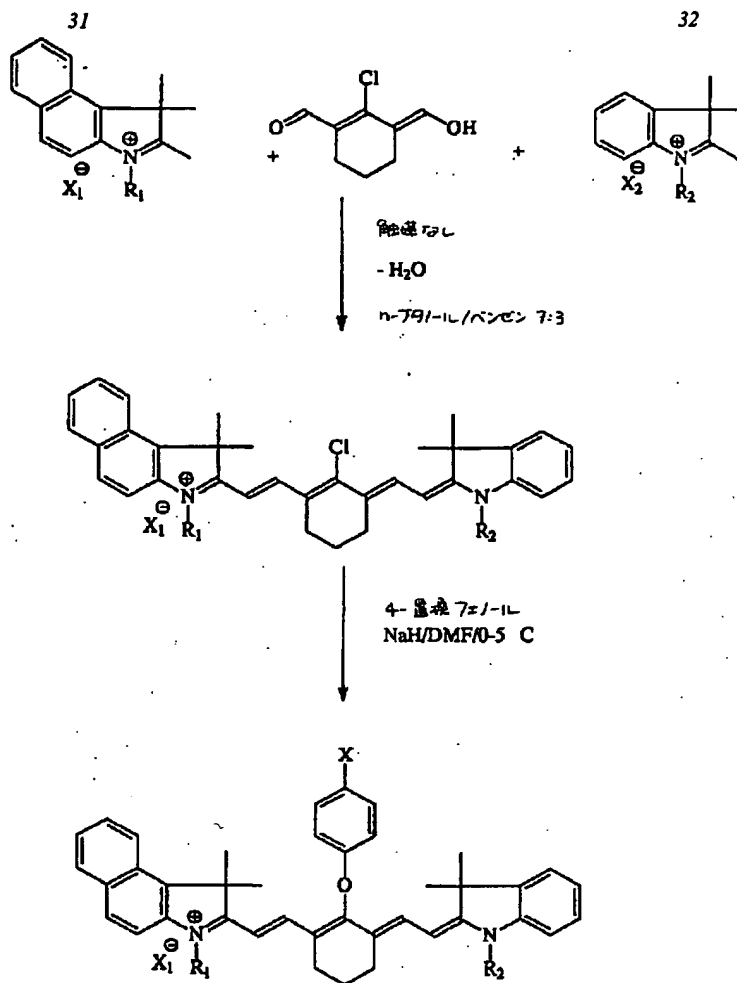


【0089】チャート3

【化28】

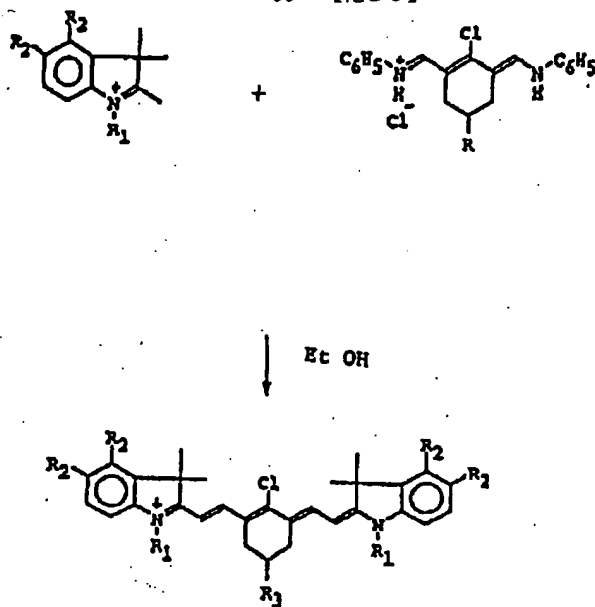
(17)

平9-23900



【0090】チャート4

【化29】

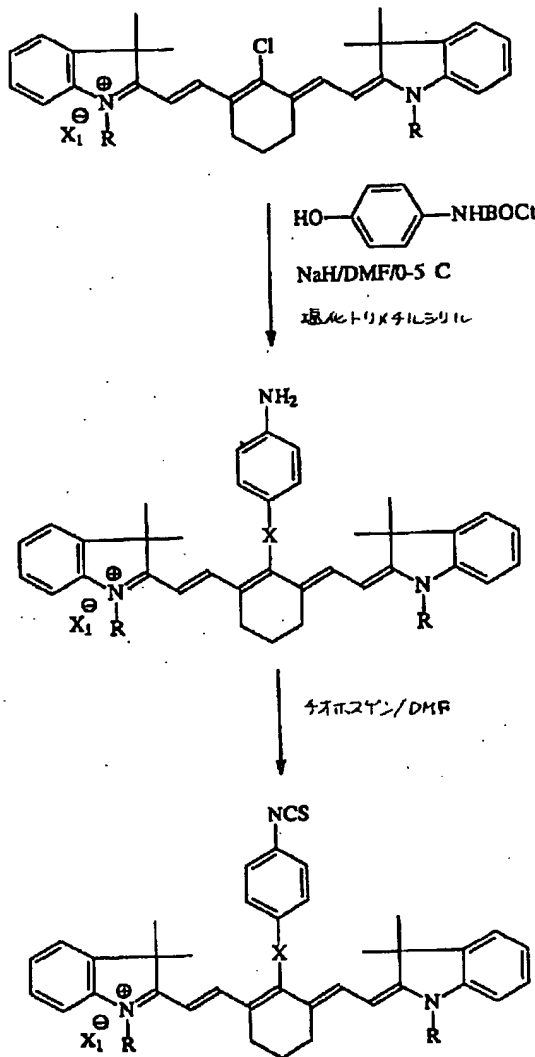


【0091】チャート5

【化30】

33

34



【0092】異なるDNAフラグメントを複数の帯に分離するために、電気泳動区分140はゲルサンドイッチ150、上部バッファアセンブリ152、サポートアセンブリ154及び、ゲルサンドイッチ150の底部を封鎖するように配置された下部バッファアセンブリ151を含む。図2の実施態様では、ゲルサンドイッチ150は垂直に維持され、その温度は操作中制御される。上部バッファアセンブリ152と下部バッファアセンブリ151とに電圧を印加することによって、複数の帯を分離させ、走査区分142によって走査する。

【0093】ゲルサンドイッチ150を支持するために、サポートアセンブリ154は1対の上部サイドブラケットと下部サイドブラケット160と162（各対の一方のみを図2に示す）、装置サポートプレート168、温度制御加熱プレート164、及び図2の166A～166Cに示すプラスチックスペーサーを含む。全構造は上部及び下部サイドブラケット160と162を取り付ける装置サポートプレート168上に支持される。

【0094】上部及び下部サイドブラケット160と162はそれぞれ、ゲルサンドイッチ150のいずれかの側から突出するピン（図示せず）を受容して、走査区分142と並置してその場に維持するような形状である。166A～166Cとして示すスペーサーは温度制御加熱プレート164を装置サポートプレート168から間隔をおいて維持して、それを周囲温度より高い一定の選択温度に維持する。好ましい実施態様では、温度を45～50℃に維持する、温度は30～80℃の範囲内に維持すべきである。

【0095】走査区分142はレーザーダイオードアセンブリ（図2に示さず）と、顕微鏡アセンブリ172と、フォトダイオード区分174と、スキャナー取り付け区分176とを含む。レーザーダイオードアセンブリ（図2に示さず）は、光線がゲルサンドイッチ150に衝突して、顕微鏡アセンブリ172を通しての最小の反射バック(reflection back)で蛍光を生じるように、斜めに配置される。

【0096】蛍光光線を受容するために、顕微鏡アセンブリ172はゲルサンドイッチ150に焦点を合わせ、それから放射される蛍光光線をフォトダイオード区分174に伝導し、区分174は蛍光光線を、アナログ及びデジタルボード146と148に伝導し、これらによって処理させるために電気シグナルに転化し、アナログ及びデジタルボード146と148がデータをさらに分析する。走査区分142は、ゲルサンドイッチ150中のカラムを横切って走査するために、この操作中にスキャナー取り付け区分176に取り付けた装置サポートプレート168中のスロットに沿って移動する。

【0097】スキャナー取り付け区分176は取り付けプレート180と、ベアリングプレート(bearing plate)182と、階動モーター184と、スライド可能な(slidable)サポート186と、ベルト/プーリー配置185、188A及び188Bを含む。取り付けプレート180はフレーム要素を介して装置サポートプレート168に可動に取り付けられ、細長いベアリングプレート182と、階動モーター184と、2個のプーリー188Aと188Bとを支持する。細長いベアリングプレート182はゲルサンドイッチ150の長さにならって伸びる。

【0098】レーザーダイオードアセンブリ(図示せず)と顕微鏡アセンブリ172とのゲルサンドイッチ150に関連した移動を可能にするために、スライド可能なサポート186は顕微鏡アセンブリ172とダイオードアセンブリとを支持し、スライド可能なベアリングプレート182上に存在する。階動モーター184の出口シャフト183はプーリー188と、ベルト185と、プーリー188Aとを介してプーリー188Bを駆動し、プーリー188Bはスライド可能なサポート186上にクランプされた(clamped)ベルト(図示せず)を駆動し、ベルト上のレーザーダイオードと顕微鏡アセンブリ172とによる走査中にベルトをゲルサンドイッチ150の長さにならって移動させる。デジタルボード148の回路の制御下にある階動モーター184はプーリー188Bを動かし、ベルト(図示せず)を動かして、ゲルサンドイッチ150の全体にならって走査させる。

【0099】この図に示すように、電気泳動電源144は上部バッファアセンブリ152中のバッファに電気的コネクタ194を介して電氣的に接続し、下部バッファアセンブリ151に図2に図示しないコネクタによって電氣的に接続する。

【0100】上部バッファアセンブリ152はバッファ溶液195を保持するための容器を形成する壁197と；上部から壁197上にフィットするリップ付きで形成され、側壁から離れて、下方に伸びる平らな要素を含み、導体211を保持するカバー199とを包含する。導体211は、カバー199の頂部に取り付けられるコネクタ194によって電源に電氣的に接続して、

バッファ溶液195への電気エネルギー供給を可能にする。

【0101】下部バッファアセンブリ151はバッファ溶液203を保持するための容器を画定する閉鎖された壁201と；容器201を閉鎖し、導体207を支え、下部バッファ溶液203にエネルギーを与えるための導体207を支えて、バッファ203中に達する、下方に伸びる部分213を有するカバー205とを含む。ゲルサンドイッチ150は下方に伸びてバッファ溶液203中に達し、上方に伸びて、バッファ溶液195中に達して、電気泳動のための電氣的接触を可能にする。“O”環197Bは、バッファ溶液195が上部バッファアセンブリ152を完全に空にしないように、上部バッファアセンブリ152のシールを形成する。

【0102】図3では、図1のライン3-3に沿った断面図を示し、これは電気泳動区分140の一部と、走査区分142(明瞭さのために、図3では2倍に表示)の一部と、一緒に取り付けけた電気泳動電源区分144(図2のみ)とを示し、上方から見た、装置サポートプレート168と、ヒータープレート164と、ゲルサンドイッチ150と、レーザーダイオードアセンブリ170と、顕微鏡アセンブリ172と、フォトダイオードアセンブリ174との配置を説明する。ヒータープレート164と装置サポートプレート168とは、レーザーダイオードアセンブリ170の両端部とそれを走査するための顕微鏡区分172とを受容する大きさの電気泳動区分140内のDNAレーン(lane)に直交する水平方向に伸びるスロットを有する。

【0103】DNA帯の分離及び走査と協調するために、ゲルサンドイッチ150はフロントガラスプレート200と、ゲル区分202と、ヒータープレート164に接触して取り付けられ、レーザーダイオードアセンブリ170と顕微鏡アセンブリ172とによる走査を受ける区分を有するリアガラスプレート204とを含む。リアガラスプレート204はヒータープレート164と接触し、ゲル区分202によってフロントガラスプレート200から分離され、ゲル区分202の範囲内では、DNA分離が行われる。フロントガラスプレート200とリアガラスプレート204とは任意の種類のガラスでよいが、好ましくは、遠赤外と近赤外領域に低い蛍光を有し、研磨なしに光学的平面を与える方法によって製造されるソーダ石灰(soda lime)である。

【0104】ゲルサンドイッチ150に光線を伝導するために、レーザーダイオードアセンブリ170はハウジング210と、集束レンズ212と、狭い帯域通過フィルタ204と、コリメーターレンズ(collimating lens)216と、レーザーダイオード218とを含む。レーザーダイオード218は遠赤外、近赤外又は赤外光線を放射し、この光線はレーザーコリメーターレンズ20

6によって平行にされ、狭い帯域通過フィルター204を通して濾過される。この光線は集束レンズ212によってゲルサンドイッチ150上に集束する。好ましくは、ゲルサンドイッチ150のゲル区分202上の焦点は顕微鏡区分172とフォトダイオード区分174との中心長軸に沿って又は近くに存在する。

【0105】ガラスプレートとゲルとの厚さ、レーザーと顕微鏡アセンブリ172の位置、したがって、レーザーからの光線の顕微鏡アセンブリ172に対する入射角度と反射角度は、ゲル及びガラスの屈折率とガラスプレートとゲルとの厚さを考慮して、レーザーからの光線がゲルに最大に伝導されるように選択する。法線に対する入射角度は第1界面におけるBrewsterの角度に等しいので、レーザーからの光線は直接には反射バックされず、屈折後に完全強度でマーカーに衝突するような光線であるが、ゲルサンドイッチ150の第1面によって顕微鏡アセンブリ172中に反射されず、顕微鏡アセンブリ172はその視線内で蛍光を発するようなマーカーを検出する(view)。

【0106】レーザーダイオード上の温度制御を維持するために、ハウジング210は(a)熱電気クーラー220を介してヒートシンクに結合する；(b)集束レンズ212と、狭い帯域通過フィルター214と、コリメーターレンズ216と、レーザーダイオード、pa218とを囲い；(c)ダイオードのための電気リードを收容する。

【0107】レーザーダイオードアセンブリ170からの光線に反応して、ゲル区分202中の蛍光マーカーによって放出される光を受容し、集束するために、顕微鏡アセンブリ172は集中レンズ230と、ハウジング232と、集束モーターとを含む。顕微鏡アセンブリ172は、集中レンズ230にその長軸の中心を置き、それが結合するフォトダイオード区分174と共に配向して配置されるのに適する。このために、ハウジング232は中央通路を含み、この中央通路には標識DNA鎖の放出蛍光に適合する通過帯域を有する1個以上の光学フィルター(図示せず)が配置される。この配置によって、集中レンズ230はゲル区分202中の蛍光物質からの光線を受容し、集中光線を光学濾過のために平行化し、フォトダイオードアセンブリ174に伝達する。

【0108】検出された蛍光を表す電気シグナルを形成するために、フォトダイオードアセンブリ174はその内部に、光センサーの主要な要素として、入口窓242と、集束レンズ244と、サファイア窓(sapphire window)246と、アバランシェフォトダイオード248とを有するハウジング240を含む。アバランシェフォトダイオード248を支持するために、ハウジング240内に検出器取り付けプレート250を取り付けて、プレートを支持し、その上にアバランシェフォトダイオード248を取り付ける。入口窓242はハウジング240

内に嵌合して、顕微鏡アセンブリ172からフォトアセンブリ174の長軸に沿って光線を受容する。

【0109】フォトダイオードアセンブリ174のハウジング240内には、サファイア窓246とアバランシェフォトダイオード248とが顕微鏡アセンブリ172とフォトダイオードアセンブリ174との共通軸に沿って配向する。集束レンズ244は顕微鏡アセンブリ172によって伝達される光線を電気シグナルに変えるためにアバランシェフォトダイオード248上の小点に集束させる。Peltier効果を利用する熱電気クーラー252を検出器取り付けプレートに隣接して取り付けて、アバランシェフォトダイオード248の適当な操作のために適した比較的低温に維持する。

【0110】この図に最も良く見られるように、階動モーター184はベルト185を回転させて、プーリー188Aを回し、次に、プーリー188Aがプーリー188Bを回転させる。プーリー188Bはそれとアイドラプーリー179との間に伸びて、スライド可能なサポート186(図2のみに図示)に一所において結合して、走査顕微鏡とレーザーとを走査のためにゲルサンドイッチ150に沿って長軸方向に移動させる。モーター184は、キャリジを前後に動かすことによって、ゲルサンドイッチ150の走査を達成する。

【0111】図4では、相互に取り付けたゲルサンドイッチ150と上部バッファアセンブリ152との一部透視図を示す、この図はゲル区分202を上部バッファアセンブリ152内のバッファ溶液に暴露させるためにリアガラスプレート204からカットオフした外部ガラスプレート200を示す。この配置によると、DNAサンプルをガラスプレート200と204との間にピペットで移し、上部バッファアセンブリ152を越えて、ゲルサンドイッチ150を通して、下部バッファ(図4に示さず)まで電気泳動によって下方に移動させる。

【0112】図5では、上部バッファアセンブリ152と各端部においてそれと結合した下部バッファアセンブリ151とを説明するための、ゲルサンドイッチ150の分解図である。この図に示すように、カバー199は接続ポスト214を含み、これはバッファ区画中へのカバー199の下方に伸びる部分に接続するための導体211を受容する。ゲルサンドイッチ150のガラスプレート200と204(図4)との間には、プレート間のゲル区分202(図4)中に複数の下方に伸びる溝231が存在する。DNAサンプルをこれらの溝にピペットで移し、下部バッファアセンブリ151へ電気泳動するためのチャンネルを形成する。

【0113】上部バッファアセンブリ152から下部バッファアセンブリ151までゲルサンドイッチ150を通る電氣的接続を形成するために、下方に伸びるプレート213まで下方に伸びて、バッファ溶液中に達

する導体207を受容するために、接続ポスト218を下部バッファアセンブリ151のカバー205に接続させる。

【0114】図6では、図2の実施態様のリモートステーション122Aの制御に用いる回路のブロック線図を示す、この回路は制御/相関/読み出し区分250と、スキャナー駆動装置176と、スキャナー駆動装置176を動かすためのモーターアセンブリ184と、感知配置252とを有する。感知配置252はレーザーアセンブリ170と、シグナルを受容し、若干のノイズを除去し、シグナルを制御/相関/読み出し区分250中の表示と読み出しのために伝達するセンサーアセンブリ174とを有し、スキャナー駆動装置176とスキャナー駆動装置モーター184は制御/相関/読み出し区分250からシグナルを受容して、ゲルサンドイッチを横切つてのセンサーの前後運動を制御する。この総合的構成は、この構成がDNAを走査し、図1～5の実施態様に従ってその配列決定をするための感知配置252と協調する限りを別として、本発明に関係しない。

【0115】センサー174を1箇所から他の箇所に駆動するために、モーターアセンブリ184は階動モーター254とモーター駆動装置256とを含む。モーター駆動装置256は制御/相関/読み出し区分250からシグナルを受容して、階動モーター254を始動させて、スキャナー駆動装置176を駆動させる。スキャナー駆動装置176はベルトとプーリー配置によって、ゲルサンドイッチ150上の電気泳動チャンネルを感知するための前後運動のために階動モーター254に機械的に連結する(図3)。階動モーター254と駆動装置回路256とは通常用いられるものであり、それだけでは本発明に関係しない。

【0116】制御/相関/読み出し区分250は、任意の標準マイクロプロセッサ260でよいコンピュータと、走査結果を表示し、印刷するための、テレビジョンディスプレイ又は陰極線管ディスプレイ262とプリンター264を含む。

【0117】データを感知するために、感知配置252は、レーザー170とセンサー174との他に、チョッパー(chopper)回路270と、センサー電源272と、前置増幅器274と、ロックイン増幅器276と、6ポ

ールフィルタ278と、12ビットアナログ/デジタルコンバーターインターフェース回路280と、レーザー電源282とを含む。

【0118】センサー174はレーザーからの光線を、それがゲルサンドイッチ150に衝突した後に受容して(図3)、前置増幅器274を介して、ロックイン増幅器276までシグナルを伝達する。センサーはセンサー電源272からシグナルを受容する。チョッパー回路272は同期化周波数でロックイン増幅器276にパルスを与える。

【0119】レーザー170は電源282から電力を受容するが、この電力は、レーザーからのシグナルがロックイン増幅器276に与えられるシグナルと同期であり、ロックイン増幅器276から6ポールフィルタ278への出力が好ましくないシグナル周波数から区別されるように、チョッパー回路270によって制御される。このシグナルは、コンピューター260へのインターフェースとして役立つ12ビットアナログ/デジタルコンバーター280においてデジタルシグナルに転化される。

【0120】この配置によると、走査速度はノイズから区別されるように設定することができ、チョッパー制御装置からの同期化復調(demodulation)がノイズをさらに減じて、特にゲルサンドイッチ150におけるガラスの天然蛍光から区別する(図2と3)。

【0121】図7では、ゲルサンドイッチ150の代わりに用いられ、毛管電気泳動に通常用いられるような、毛管カラム61、63及び65を含む。これらのカラムにバッファ溶液又はゲルを充填して、電気泳動に用いる。このような場合に、図2～5の実施態様のゲルサンドイッチ150の代替品として数本の毛管を用いることができる。したがって、A、G、C及びT型の塩基の同じ帯が毛管の幾つかの平行な束を通して流れることができる、又はこれらは1種類の塩基につき1本のみの毛管を通して流れることができる；或いは、A、G、C及びT型の塩基の帯を一緒にして、1本のみの毛管に通して流すことができる。

【0122】例えば、ゲルチャンネル又は長い毛管のような分離路は50～10、000以上の塩基のDNAの長さの範囲に対して2m以下であるべきである。しかし、DNA長さの範囲が増大するにつれて、所要時間が長くなる。また、各分離に要する時間は長さ分離の各塩基の追加あたり1/2秒間から5分間までの範囲内である。

【0123】上記概要から、本発明の蛍光標識DNAの配列決定方法が、例えば(1)染料がそれらの発光スペクトルを遠赤外、近赤外又は赤外光線スペクトルに有するので、小型で安価なダイオードレーザーを用いることができる；(2)この波長領域はガラスにおいて比較的低いバックグラウンド蛍光を特徴とするので、受容するシグナルにノイズが少ないと言うような、幾つかの利点を有することは理解することができる。

【0124】本発明の好ましい実施態様を特に記載したが、上記説明を考慮して、好ましい実施態様の多くの修正及び変更が可能である。したがって、特許請求の範囲内で、本発明を特に説明した以外に実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に有用な配列決定装置の実施態様の透視図。

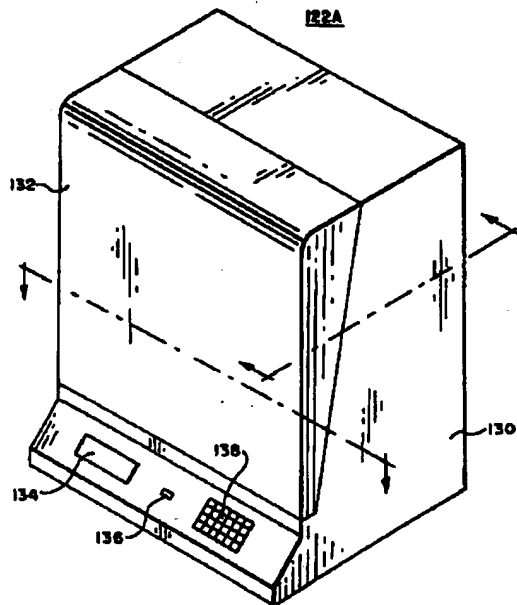
41

- 【図2】図1のライン2-2に沿った断面図。
 【図3】図1のライン3-3に沿った断面図。
 【図4】図2の実施態様の一部の分解組み立て透視図。
 【図5】図2の実施態様の一部の部分的分解拡大図。
 【図6】センサー、スキャナー駆動装置及び使用レーザーの協調のために使用可能な回路のブロック線図。
 【図7】図1～6の実施態様に用いられるゲルサンドイッチの代わりに使用可能である電気泳動装置の実施態様。

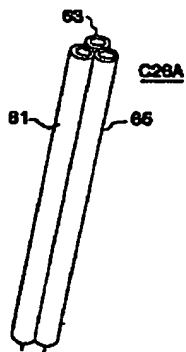
【符号の説明】

144. 電気泳動電源
 146. アナログボード
 148. デジタルボード
 150. ゲルサンドイッチ
 151. 下部バッファアセンブリ

【図1】



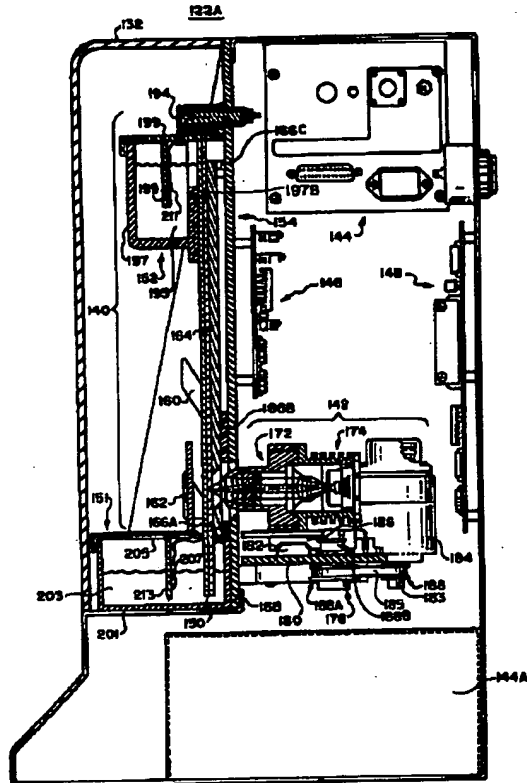
【図7】



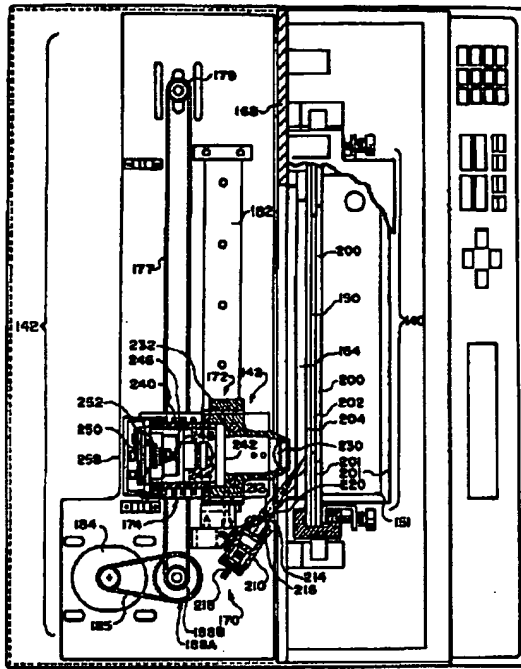
42

152. 上部バッファアセンブリ
 164. ヒータープレート.
 168. 装置サポートプレート
 170. レーザーダイオード
 172. 顕微鏡アセンブリ
 174. フォトダイオードアセンブリ
 184. 駆動モーター
 185. ベルト
 188. プーリー
 194. 電気的コネクタ
 195. バッファ溶液
 199. カバー
 211. 導体
 218. レーザーダイオード

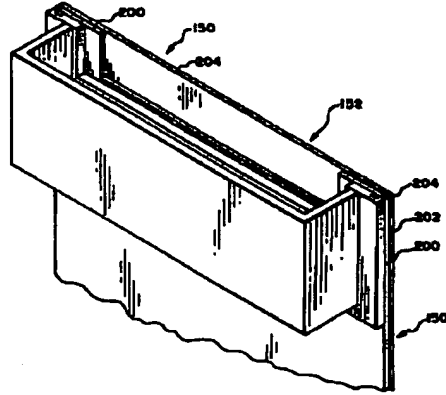
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

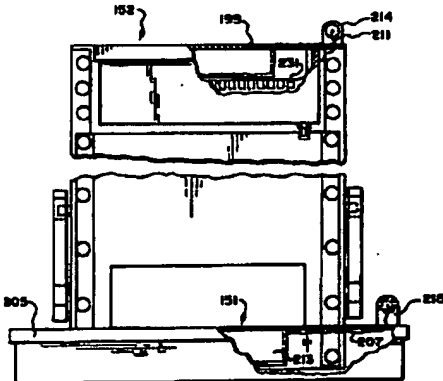


Figure 1 is a block diagram of a laser printer system. The system is divided into two main sections by a dashed line 250: a computer section (280) and a printer section (164).
 In the computer section (280), there is a computer (280) connected to a printer (164). The computer is also connected to a 12-bit A/D converter (280).
 In the printer section (164), the signal path is as follows:
 - The 12-bit A/D converter (280) outputs to a 6-stage filter (276).
 - The 6-stage filter (276) outputs to a lock-in amplifier (276).
 - The lock-in amplifier (276) outputs to a pre-amplifier (274).
 - The pre-amplifier (274) outputs to a sensor (174).
 - The sensor (174) outputs to a sensor power source (272).
 - A chopping circuit (270) is connected to the lock-in amplifier (276).
 - A power source (282) is connected to the lock-in amplifier (276) and a laser (170).
 - The sensor power source (272) is connected to the sensor (174).
 - The printer (164) also includes a stepper motor (254) and a motor driver (256).
 - A dashed line 250 separates the printer's internal components from the computer.

(72)発明者 ライル・アール・ミデンドルフ
アメリカ合衆国ネブラスカ州68505, リン
カーン, サンボーン・ドライブ 8135

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.